

PATENT APPLICATION
IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Docket No: Q86049

Nicoletta BIANCHI, et al.

Application No.: 10/522,737

Group Art Unit: 1614

Confirmation No.: 8521

Examiner: Brian Yong S KWON

Filed: October 12, 2005

For: USE OF ANGELICIN AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES FOR THE
TREATMENT OF THALASSEMIA

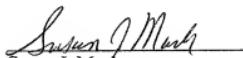
SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of the priority document on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority document.

Respectfully submitted,



Susan J. Mack
Registration No. 30,951

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

23373

CUSTOMER NUMBER

Enclosures: TO2002A000684
Date: February 27, 2009



26.06.03

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 08 SEP 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale

N. TO2002 A 000684



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'escluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il 12 AGO. 2003

IL DIRIGENTE
Elena Marinelli
Sign. E. MARINELLI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIENDENTE (I)

1) Denominazione **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA**Residenza **FERRARA** FE codice **004846905844**2) Denominazione **ASSOCIAZIONE VENETA PER LA LOTTA ALLA TALASSEMIA**Residenza **ROVIGO** RO codice **800098502560**

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIENDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **EDGARDO DEAMBROGI**

(Iscr. N. 931B) ed. altrri. cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **Jacobacci & Partners S.p.A.**via **CORSO Regio Parco** n. **24** città **TORINO** cap **10152** (prov) **TO**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via **====** n. **====** città **=====** cap **=====** (prov) **=====**

D. TITOLO

classe proposta (sezi/sez) **====** gruppo/ottogruppo **====****NUOVO USO DELL'ANGELICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALI**ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NOSE ISTANZA: DATA **11/11/02**N° PROTOCOLLO **=====**

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) **BIANCHI NICOLETTA**2) **BORGATTI MONICA**

cognome nome

3) **CAMBARI ROBERTO**4) **LAMPRONTI ILARIA**

F. PRIORITY

azione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	stato	SCIOLGIMENTO RISERVE
1)			SR	Date ===== N° Protocollo =====
2)				

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione



H. ANNOTAZIONI SPECIALI

I TITOLARI PARTECIPANO AI DIRITTI SUL BREVETTO NEGLI SEGUENTI MISURE:
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA 90% ASSOCIAZIONE VENETA PER LA
 LOTTA ALLA TALASSEMIA 10%, AI SENSI DELLA L. 1127/39.**

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA/CARICO SEGUONO.

N. ex:

Doc. 1)	<input checked="" type="checkbox"/>	n. pag. 15	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ...	SCIOLGIMENTO RISERVE DUE
Doc. 2)	<input checked="" type="checkbox"/>	n. tav. 10	disegno (obbligatorio se diverso da descrizione, 3 esemplari)	=====
Doc. 3)	<input checked="" type="checkbox"/>		dichiarazione sostitutiva di certificazione (titolo d'interessi, prezzo o riferimento prezzo generale)	=====
Doc. 4)	<input checked="" type="checkbox"/>		designazione inventore	=====
Doc. 5)	<input checked="" type="checkbox"/>		documenti di priorità con traduzione in italiano	=====
Doc. 6)	<input checked="" type="checkbox"/>		autorizzazione o etto di cessione	=====
Doc. 7)	<input checked="" type="checkbox"/>		nomina/voce completo del richiedente	=====

8) attestato di versamento, totale lire **CENTOTTANTOPOTTO/51** obbligatorioCOMPILATO IL **14/11/2002** FIRMA DEL (I) RICHIENDENTE (I) **EDGARDO DEAMBROGI**

(Iscr. N. 931B)

CONTINUA SINO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIENDE COPIA AUTENTICA SINO **SI**

Jacobacci & Partners S.p.A.

C. C. L. A. A. DI TORINO codice **031**VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **10 2002 A 0 0 0 684**L'anno **2002** giorno **10** del mese di **Trentuno** fogli paginanti per la concessione del brevetto **1**Il (I) richiedente (I) ha (hanno) presentato e me sottoscritto la presente domanda, chiedendo **00** fogli paginanti per la concessione del brevetto **1**

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE
DUFO CHIALE



L'UFFICIALE ROGANTE
Mirella Cavallari
Mirella CAVALLARI
CATEGORIA C

-IASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

2002 A 000684

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

31/07/2002

DATA DI RILASCI

31/07/2002

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA
FERRARA FE

Residenza

D. TITOLO

NUOVO USO DELL'ANGELICINA E DI SUOI ANALOGHI STRUTTURALI

Classe proposta (sez,cl,sc)

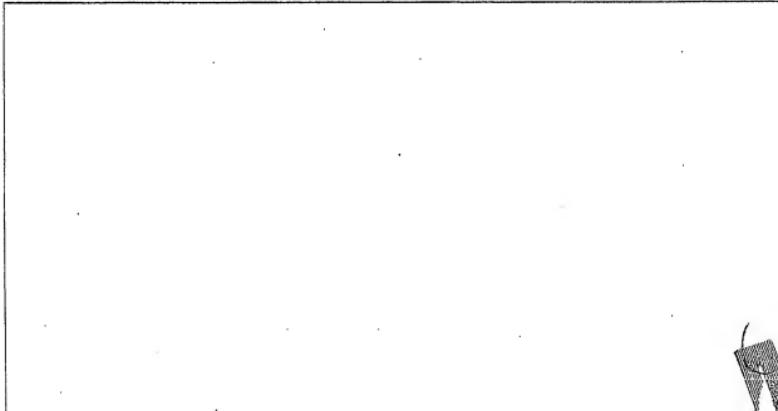
(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

E' descritto l'uso dell'angelicina e di suoi analoghi strutturali per la preparazione di un medicamento per il trattamento della beta-talassemia. Un analogo strutturale particolarmente preferito a tale scopo è il bergaptene.



M. DISEGNO



Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Nuovo uso dell'angelicina e di suoi analoghi strutturali".

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità italiana, Via Savonarola 9, Ferrara (IT); Associazione Veneta per la lotta alla Talassemia, nazionalità italiana, c/o Centro di Microcitemia dell'Azienda ULSS 18, Rovigo, (IT).

Inventori designati: BIANCHI, Nicoletta; BORGATTI Monica; GAMBARI, Roberto; LAMPRONTI Ilaria.

Depositata il: 31 luglio 2002

2002 A 000684

* * * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo uso terapeutico dell'angelicina e di suoi analoghi strutturali, come molecole in grado di indurre il differenziamento cellulare eritroide e di incrementare la produzione di RNA messaggero per la gamma-globina.

L'esistenza di sostanze in grado di indurre l'espressione del gene per la gamma-globina e la biosintesi di emoglobina fetale (HbF) in soggetti adulti è nota da tempo (1). Nella maggior parte dei casi, tali sostanze sono anche in grado di attivare o potenziare la trascrizione dei geni per le globine embrionali e fetalì in sistemi sperimentali modello.

Recentemente, ad esempio, sono state descritte numerose molecole leganti il DNA aventi la capacità di indurre un aumento dell'espressione dei geni per le gamma-globine (2). Tra queste citiamo il cisplatino e analoghi del cisplatino, la mitramicina, la cromomicina e la tallimustina (3). Queste molecole sono efficaci modificatori dell'espressione dei geni per la globina gamma.

Nell'essere umano, l'attivazione della trascrizione dei geni per le globine gamma in soggetti adulti conduce alla produzione di emoglobina fetale mimando il fenotipo HPFH (High Persistence of Fetal Hemoglobin) che conferisce un quadro clinico favorevole a pazienti affetti da beta-talassemia, anche in forma omozigote (4). Una terapia che preveda l'impiego di molecole aventi tale attività per il trattamento di pazienti affetti da beta-talassemia potrebbe pertanto rendere tali soggetti maggiormente indipendenti dalla terapia trasfusionale (5).

Alla base della presente invenzione vi è la necessità di nuovi modificatori del processo di trascrizione utilizzabili nel trattamento della beta-talassemia che presentino un elevato livello di induzione dell'espressione dei geni gamma-globinici e contemporaneamente un effetto citotossico ridotto

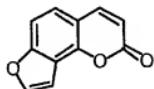
rispetto a quello di farmaci di riferimento.

E' stato da noi sorprendentemente trovato che l'angelicina - un derivato iso-psoralenico che possiede attività fotochemioterapica - così come i suoi analoghi strutturali, possiedono tale attività. In particolare, è stato trovato che l'angelicina ed i suoi analoghi strutturali sono in grado di potenziare l'espressione del gene per la globina gamma umana.

Tale attività è inaspettata alla luce degli utilizzi terapeutici noti dell'angelicina e dei suoi analoghi strutturali (6-18).

L'angelicina è infatti stata proposta in letteratura per il trattamento della psoriasi (12,13), come agente antiproliferativo (14,15,16) e antifungino (8) e come agente antiinfiammatorio (17).

La formula di struttura dell'angelicina è la seguente:



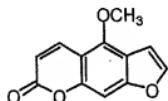
Angelicina (2-oxo-(2H)-furo(2,3-h)-1-benzopirano)

La sintesi chimica dell'angelicina e dei suoi analoghi strutturali è stata descritta in letteratura (si vedano ad esempio i riferimenti 6-11).



Analoghi strutturali dell'angelicina sono ad esempio le cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, gli eteroanalogni dell'angelicina, i tiopirano-benzofurani, le acilangelicine, le alchilangelicine, le alcossicarbamoilangelicine, gli psoraleni e gli isopsoraleni eventualmente sostituiti. Un esempio specifico è l'analogo furanocumarinico lineare bergaptene (5-metossipsoralene), che viene attualmente utilizzato nella terapia PUVA (Psoraleni più radiazioni UVA) per la cura della psoriasi.

La formula di struttura del bergaptene è la seguente:



Bergaptene (5-metoxypsoralene)

Grazie alla loro capacità di potenziare l'espressione del gene per la globina gamma umana, l'angelicina e i suoi analoghi strutturali possono essere vantaggiosamente utilizzati per il trattamento terapeutico di pazienti affetti da beta-talassemia.

Un primo oggetto della presente invenzione è quindi l'uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale per la preparazione di un medicamento per il

trattamento terapeutico della beta-talassemia.

Preferibilmente, detto analogo strutturale è scelto dal gruppo che consiste di cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, eteroanalogni dell'angelicina, tiopirano-benzofurani, acilangelicine, alchilangelicine, alcossicarbamoilangelicine, psoraleni e isopsoraleni eventualmente sostituiti.

Un analogo strutturale particolarmente preferito è il bergaptene.

Inoltre, come è stato recentemente descritto (18, 19), un trattamento combinato con diversi modificatori del processo di trascrizione permette di incrementare ulteriormente l'espressione dei geni per la globina gamma.

Conseguentemente, un secondo oggetto della presente invenzione è l'uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale in combinazione con almeno un ulteriore modificatore del processo di trascrizione per la preparazione di un medicamento per il trattamento della beta-talassemia.

Secondo una forma di attuazione preferita, detto ulteriore modificatore del processo di trascrizione è scelto nel gruppo che consiste di citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina,

idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP). Tra questi sono maggiormente preferiti citosina arabinosidé ed acido retinoico.

L'attività dell'angelicina come induttore del differenziamento cellulare eritroide e della produzione di mRNA per la gamma-globina è stata valutata in colture di cellule umane.

I risultati di tale studio sono illustrati negli esempi che seguono. I dati riportati negli esempi indicano che l'attività dell'angelicina è superiore rispetto a quella dell'idrossiurea, un farmaco di riferimento per l'induzione di emoglobina fetale (HbF). Inoltre è stato verificato che l'effetto citotossico riscontrabile è molto inferiore a quello dell'idrossiurea.

Gli esempi che seguono vengono forniti a scopo di illustrazione e non sono intesi a limitare in alcun modo la portata dell'invenzione.

Esempio 1

La valutazione dell'attività biologica dell'angelicina è stata condotta esaminando la capacità di tale composto di modulare l'espressione dei geni per la globina gamma nella linea cellulare umana K562, che è in grado di differenziare in senso

eritroide esprimendo i geni per la globina gamma se sottoposta a trattamento con modificatori della risposta biologica adatti a tale scopo (3,18,19).

Il livello di differenziamento è stato valutato analizzando la positività delle cellule alla benzidina (3). La produzione di emoglobina è stata valutata mediante elettroforesi su acetato di cellulosa e colorazione del gel con una soluzione a base di benzidina/H₂O₂ (3). L'espressione dei geni codificanti per le globine gamma è stata valutata mediante RT-PCR (reverse transcriptase PCR) quantitativa (3).

Alcuni tra i dati ottenuti sono riportati in tabella 1. Come si può facilmente notare, l'angelicina (400 μ M) è in grado di indurre un incremento della percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (55-60% delle cellule trattate, paragonato al 3-4% delle cellule K562 di controllo). L'emoglobina prodotta in modo preponderante dalle cellule K562 trattate con l'angelicina è l'Hb Portland (alfa2gamma2). I dati ottenuti con la RT-PCR quantitativa dimostrano che tale effetto sul differenziamento è associato ad un aumento dell'accumulo intracitoplasmatico di mRNA per la globina gamma. Tali valutazioni sono state eseguite dopo 6 giorni di induzione con angelicina 400 μ M.



Anche il bergaptene mostra la capacità di indurre il differenziamento (misurato come incremento di cellule positive alla benzidina), anche se questa capacità è associata ad un incremento inferiore dell'accumulo di mRNA per la globina.

L'induzione del differenziamento eritroide in cellule trattate con angelicina è molto simile a quello ottenuto con citosina arabinoside, uno degli induttori noti più efficaci (18, 19). Tuttavia, l'attività dell'angelicina sull'incremento di produzione dell'mRNA per la globina gamma è significativamente superiore a quella della citosina arabinoside.

Tabella 1

Composto	Concentrazione (μ M)	^(a) Differenziamento eritroide (%)	^(b) mRNA per la globina gamma
-	-	3-4	1
citosina arabinoside	1	75-80	3,24
bergaptene	200	50-60	3,48
angelicina	400	55-60	44,94

(a) Differenziamento eritroide = percentuale di cellule K562 positive alla benzidina (media \pm SD di sei esperimenti). Le concentrazioni indicate sono

quelle ottimali per ogni molecola al fine di ottenere l'attivazione del differenziamento eritroide. Incrementando tali concentrazioni si ottiene una diminuzione dell'effetto sui parametri differenziativi, in associazione ad un'attività citotossica delle molecole stesse.

(b) L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in tabella come incremento rispetto a quello di cellule K562 di controllo non trattate. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (22,23) utilizzando i seguenti oligonucleotidi-primer e sonda: gamma-globin forward primer, 5'-TGG CAA GAA GGT GCT GAC TTC-3'; gamma-globin reverse primer, 5'-TCA CTC AGC TGG GCA AAG G-3'; sonda gamma-globin, 5'-FAM-TGG GAG ATG CCA TAA AGC ACC TGG-TAMRA-3' (FAM = 6-carbossi fluoresceina, TAMRA = 6-carbossi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina). Le analisi sono state eseguite su materiale estratto da cellule trattate per 6 giorni alle condizioni indicate.

Esempio 2

Per verificare se l'angelicina sia anche in grado di stimolare la produzione di mRNA per la gamma-globina in precursori eritroidi umani isolati da sangue periferico, è stata impiegata la tecnica pubblicata da Fibach et al. (20,21). Questa tecnica

prevede due fasi: nella prima fase le cellule isolate da sangue periferico di un soggetto sano o affetto da una patologia emopoietica, come l'anemia falciforme o la β -talassemia, vengono seminate in terreno di coltura addizionato del 10% di medium condizionato derivante dalla linea cellulare di carcinoma di vescica 5637. La seconda fase consiste nel coltivare le cellule isolate in un terreno di coltura adatto, addizionato dell'ormone eritropoietina, 30% di siero fetale bovino, 2-mercaptoetanolo, albumina, glutamina e desametasone per permettere la proliferazione e la maturazione delle cellule staminali di tipo eritroide. In questa fase le cellule possono essere trattate con potenziali induttori di HbF. Ad esempio, con questo sistema era stato dimostrato che l'idrossiurea, un inibitore della sintesi del DNA utilizzato attualmente nella terapia sperimentale della β -talassemia, è in grado di indurre la produzione di HbF.

I risultati ottenuti utilizzando questa tecnica hanno dimostrato un incremento nella produzione di mRNA per la gamma-globina in cellule trattate con angelicina rispetto alle stesse non trattate (20,53 volte). Tale incremento è superiore a quello riscontrabile utilizzando idrossiurea (tabella 2).

Tabella 2

Composto	Concentrazione (μ M)	32 mRNA per la globina gamma
-	-	1
angelicina	500	20,53
idrossiurea	120	6,96

(a) L'accumulo di RNA per la globina gamma è riportato in tabella come incremento rispetto a quello di precursori eritroidi di controllo non trattati. La tecnica utilizzata è quella della RT-PCR quantitativa (22,23) utilizzando gli oligonucleotidi primer e sonda descritti nella tabella 1. L'idrossiurea è stata utilizzata alla concentrazione di 120 μ M poiché questa molecola a concentrazioni confrontabili con quelle utilizzate per l'angelicina presenta un'elevata attività citotossica. Tale attività altamente citotossica comincia a riscontrarsi a concentrazioni superiori a 250-300 μ M.

Bibliografia

1. Rodgers GP, Rachmilewitz EA, British J. Haematology, 91:263-268, 1995.
2. Rochette J, Craig JE e Thein SL, Blood Reviews, 8: 213-224, 1994.
3. Bianchi N, Chiarabelli C, Borgatti M, Mischiati C, Fibach E, Gambari R. Br J Haematol, 113(4):951-61, 2001.
4. Dover GJ, Brusilow S, Samid D, New England Journal of Medicine, 327: 569-570, 1992.
5. Ikuta T, Atweh G, Boosalis V, White GL, De Fonseca S, Boosalis M, Faller DV, Perrine SP, Annals of New York Academy of Sciences, 850:87-99, 1998.
6. Kong LD, Tan RX, Woo AY, Cheng CH. Pharmacol Toxicol, 88(2):75-80, 2001.
7. Mosti L, Lo Presti E, Menozzi G, Marzano C, Baccichetti F, Falcone G, Filippelli W, Piucci B. Il Farmaco, 53(8-9):602-10, 1998.
8. Sardari S, Mori Y, Horita K, Micetich RG, Nishibe S, Daneshtalab M. Bioorg Med Chem, 7(9):1933-40, 1999.
9. Jakobs AE, Christiaens L. J Org Chem, 61(14):4842-4844, 1996.
10. Iester M, Fossa Py, Menozzi G, Mosti L, Braccichetti F, Marzano C, Simonato M. Il Farmaco, 50 (10): 669-678, 1995.



JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

11. Bisagni E. Photochem Photobiol, Review, 14(1-2):23-46, 1992.
12. Dall'Acqua F, Vedaldi D, Bordin F, Baccichetti F, Carlassare F, Tamaro M, Rodighiero P, Pastorini G, Guiotto A, Recchia G, Cristofolini. J Med Chem, 26(6):870-6, 1983.
13. Dall'Acqua F, Vedaldi D, Guiotto A, Rodighiero P, Carlassare F, Baccichetti F, Bordin F. J Med Chem, 24(7):806-11, 1981.
14. Conconi MT, Montesi F, Parnigotto PP. Pharmacol Toxicol, 82(4):193-8, 1998.
15. Marzano C, Severin E, Pani B, Guiotto A, Bordin F. Environ Mol Mutagen, 29(3):256-64, 1997.
16. Bordin F, Dall'Acqua F, Guiotto A. Pharmacol Ther, Review, 52(3):331-63, 1991.
17. Backhouse CN, Delporte CL, Negrete RE, Erazo S, Zuniga A, Pinto A, Cassels BK. J. Ethnopharmacol, 78(1): 27-31, 2001.
18. Bianchi N, Ongaro F, Chiarabelli C, Gualandi L, Mischiati C, Bergamini P, Gambari R. Biochem Pharmacol, 60:31-40, 2000.
19. Bianchi N, Osti F, Rutigliano C, Ginanni Corradini F, Borsetti E, Tomassetti M, Mischiati C, Feriutto G e Gambari R, British Journal of Haematology, 104:258-263, 1999.

20. Fibach E. Hemoglobin, 22: 445-458, 1998.
21. Fibach E, Burke KP, Schechter AN, Noguchi CT & Rodgers GP. Blood, 81: 1630-1635, 1993.
22. Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM. Genome Research, 6: 986-994, 1996.
23. Gibson UE, Heid CA & Williams PM. Genome Research, 6: 995-1001, 1996.

RIVENDICAZIONI

1. Uso dell'angelicina o di un suo analogo strutturale per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della beta-talassemia.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto analogo strutturale è scelto dal gruppo che consiste di cumarine lineari ed angolari eventualmente sostituite, eteroanalogni dell'angelicina, tiopiranobenzofurani, acilangelicine, alchilangelicine, alcossicarbamoilangelicine, psoraleni e isopsoraleni eventualmente sostituiti.
3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui detto analogo strutturale è il bergaptene.
4. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta angelicina o analogo strutturale è in combinazione con almeno un ulteriore modificatore del processo di trascrizione.
5. Uso secondo la rivendicazione 4, in cui detto ulteriore modificatore del processo di trascrizione è scelto nel gruppo che consiste di citosina arabinoside, acido retinoico, plicamicina, mitramicina, idrossiurea, guanina, guanosina trifosfato (GTP), guanosina difosfato (GDP) e guanosina monofosfato (GMP).



PER INCARICO
EDUARDO DEAMBROGI
(iscr. N° 991B)